



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EXPRESIÓN, CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN
ESTRUCTURAL POR RMN DE LA GS-TAMAPINA**

INFORME DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. BELÉN ERNESTINA RAMÍREZ CORDERO



TUTOR: Dr. J. Federico del Río Portilla

AÑO: 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

H. Jurado

Presidente

Dra. Adela Rodríguez Romero. Instituto de Química, UNAM

Vocal

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros. Instituto de Química, UNAM

Vocal

Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas, CINVESTAV, IPN

Vocal

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda, Facultad de Química, UNAM

Secretario

Dr. José Alfredo Vázquez Martínez, Facultad de Química, UNAM

Lugares donde se desarrolló el tema:

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Federico del Río Portilla, en los siguientes laboratorios:

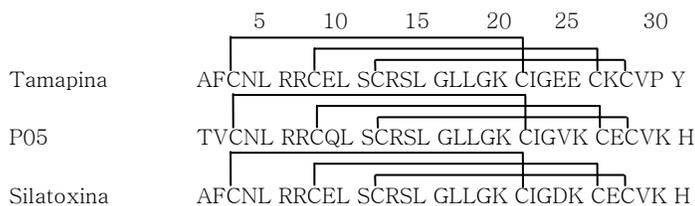
Laboratorio de Bioquímica 1, Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Química, UNAM

RESUMEN

La tamapina es una toxina del veneno del alacrán rojo de la India (*Mesobuthus Tamulus*), aislada por Pedarzani¹, que tiene la capacidad de bloquear canales de potasio de baja conductancia dependientes de calcio (SK o K_{Ca}), específicamente el canal de tipo 2 de humano K_{Ca}2.1 (h).^{1, 2} Este péptido pertenece a la subfamilia α Ktx 5, la cual posee la estructura general de dos hebras β y una hélice α ^{3,4,5} estabilizada por tres puentes disulfuro. Sin embargo, su estructura terciaria aún no ha sido reportada. A pesar de que su secuencia es muy similar a otras toxinas como PO5 y silatoxina, posee mejor selectividad y actividad. Su alta especificidad ha dado la pauta para tomarla como modelo para poder explicar el mecanismo de interacción de este tipo de toxinas con los canales K_{Ca}.



En este proyecto se ha trabajado en la obtención de la tamapina por métodos recombinantes empleando como vector de clonación el plásmido pET32a modificado. En colaboración con el Dr. Luis Brieba de Castro se obtuvo el plásmido que contiene la secuencia codificante de la tamapina, la cual está contenida en una proteína de fusión que tiene un dominio de tiorredoxina, una secuencia de histidinas y un sitio de reconocimiento para el corte con la proteasa trombina.

Se logró expresar la proteína de fusión en cepas de *E. coli* rosetta gami con un rendimiento de 20 mg/L de cultivo, cortar la proteína de fusión y obtener la toxina con dos residuos adicionales en el amino terminal (glicina y serina) con rendimiento de 1.7 mg/L de cultivo. Después de cortar la proteína de fusión, la GS-tamapina se purificó por cromatografía de líquidos, donde sólo se observa un pico del peso esperado. La GS-tamapina purificada por HPLC se liofilizó, se le realizaron pruebas de caracterización y se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN - ¹H). Se ha logrado asignar el 94% de los espectros COSY y TOCSY, y el 75% del espectro NOESY.

INTRODUCCIÓN

Varios grupos mexicanos de investigación bioquímica han colaborado con grupos extranjeros de RMN para determinar las estructuras de proteínas aisladas y caracterizadas en México.^{6,7} Sin embargo, aún no se logra la consolidación de un grupo de RMN mexicano para la obtención de estas estructuras en el país, pese a la importancia de esta área del conocimiento. En este proyecto se plantea el estudio de la estructura de la tamapina desde la obtención de la muestra hasta la obtención de la estructura tridimensional en disolución empleando RMN.

Los canales de potasio de baja conductancia dependientes de Ca^{2+} se encuentran ampliamente distribuidos en neuronas y su actividad ha sido relacionada con los fenómenos de transporte de K^+ después de la hiperpolarización de estas células. Se ha logrado determinar la estructura de las subunidades que conforman a estos canales. Sin embargo, no está completamente definida la correlación entre el arreglo real de las subunidades y las corrientes nativas del canal.

En el año 2005 Adreotti³ publicó la modelación molecular y el estudio de acoplamiento entre toxinas de alacrán y canales de potasio de baja conductancia dependientes de Ca^{2+} . Siendo la tamapina una de las toxinas modeladas. En este proyecto se obtuvo una estructura teórica de la tamapina empleando como “molde” la estructura de la Leiurotoxina. Se determinó que los residuos que interaccionan directamente con el canal SK2 son la tirosina 31 y las argininas 6, 7 y 13.

La determinación tridimensional de la estructura de proteínas y de ácidos nucleicos provee conocimientos importantes sobre las preguntas básicas acerca de cómo los organismos vivos funcionan y cambian, y como las alteraciones particulares pueden guiar al entendimiento de las enfermedades humanas. La RMN permite determinar la estructura a nivel atómico de una gran variedad de compuestos, entre ellos se encuentran las proteínas. Establecer el arreglo tridimensional de estos compuestos biológicos y en particular péptidos pequeños empleando RMN, como los presentes en el veneno de alacrán,⁸ permiten comprender procesos específicos como las formas de controlar los canales de sodio o bloquear los canales de potasio y calcio.

MARCO TEÓRICO

Venenos de alacrán

Los venenos de alacrán son mezclas acuosas complejas que contienen sales inorgánicas, compuestos orgánicos de bajo peso molecular y especialmente ricos en proteínas pequeñas que han sido llamadas toxinas o neurotoxinas. Las toxinas son péptidos especializados que afectan blancos como la membrana celular, receptores y canales iónicos. En consecuencia, los efectos fisiológicos que tienen sobre organismos pueden ser la desestabilización de la membrana, alteración en la actividad muscular y bloqueo del sistema nervioso central y periférico.⁹ El tipo de toxinas que contiene cada veneno depende principalmente de la especie y de la región donde se encuentre el alacrán. Una cantidad apreciable de diferentes péptidos se ha purificado y clasificado en 12 subfamilias, basándose principalmente en similitudes estructurales.⁴

Los péptidos constituyentes del veneno de alacrán son principalmente moduladores del mecanismo de apertura y cierre de los canales de sodio o bloqueadores de canales de potasio. Se pueden dividir en dos grandes grupos dependiendo de su tamaño molecular, las de cadena larga (60 – 80 aminoácidos) que suelen asociarse con moduladores de los canales de Na^+ y las que bloquean específicamente canales iónicos de K^+ (Ktx), que son péptidos de 23 a 64 aminoácidos. Las del segundo grupo actúan sobre canales dependientes de voltaje (Kv) y a algunos canales dependientes de Ca^{2+} .^{2,8} Algunas de estas proteínas han mostrado ser de gran valor farmacológico para estudiar la estructura molecular, la función y la diversidad de los canales de potasio.¹⁰ Es importante mencionar que las toxinas peptídicas del veneno de alacrán no cristalizan fácilmente, por lo que la técnica comúnmente empleada para determinar su estructura tridimensional es la RMN.

Resonancia Magnética Nuclear de Proteínas

Las técnicas de RMN unidimensional proveen información invaluable para la determinación de características estructurales en moléculas pequeñas; desafortunadamente estas técnicas tienen una aplicabilidad limitada para obtener información de muestras más complejas, como lo son las biomoléculas, casos en los que el traslape de señales es un problema importante. En el caso particular de las proteínas, dependiendo del tamaño de éstas, es posible que varias decenas o cientos de protones se encuentren en la misma región del espectro, lo cual hace imposible asignar las señales empleando técnicas de RMN unidimensional. Así, la introducción de técnicas de RMN multidimensional ha desempeñado un papel fundamental para la resolución de la estructura de biomoléculas,¹¹ el uso de marcaje isotópico uniforme de proteínas y ARN con isótopos activos en RMN, como ^{13}C y ^{15}N , ha abierto las posibilidades para realizar análisis detallados de la estructura de macromoléculas, estudios de dinámica e interacciones entre moléculas de hasta 60 kDa.¹²⁻²⁴

Existen varios experimentos que han sido empleados para la determinación estructural de proteínas²⁵. Se han realizado varios estudios para determinar la factibilidad de obtener estructuras empleando RMN,²⁶ para hacer comparaciones con datos de rayos X,²⁷ o como herramienta complementaria en proteómica estructural.²⁸

RMN bidimensional. En este proyecto se emplearon experimentos de RMN en dos dimensiones con el fin de determinar la estructura terciaria de la tamapina. Los espectros en dos dimensiones son relativamente sencillos de interpretar, en general la grafica de éstos tiene tres ejes, en uno se encuentra la intensidad y los otros dos corresponden a frecuencias; así, cada pico de un espectro bidimensional tiene una intensidad y coordenadas en dos ejes de frecuencia. Las frecuencias representadas en cada eje dependen de cada experimento particular.

La forma general de representar un experimento en dos dimensiones se muestra en la figura 1. Un experimento en dos dimensiones consta de cuatro tiempos importantes, el tiempo de preparación, el de evolución, el de mezclado y la detección. Durante el *tiempo de preparación* la magnetización al equilibrio, M , es manipulada de tal forma que se genere coherencia (magnetización en el plano x/y). La preparación puede ser desde un pulso de radiofrecuencia 90° , como en el experimento COSY, hasta una serie compleja de pulsos y tiempos de espera. El *periodo de evolución*, t_1 , es un tiempo variable que se incrementa sistemáticamente en series de experimentos separados, en este periodo la coherencia evoluciona. Es importante mencionar que durante el tiempo de evolución, la coherencia deseada no necesariamente es una observable. En el *periodo de mezclado* la coherencia es manipulada después de haber evolucionado para obtener una señal observable que pueda ser registrada durante el *periodo de detección*. En general, durante el tiempo de mezclado es común que se realice la transferencia de coherencia entre núcleos; por ejemplo, a través del acoplamiento escalar. La manipulación de la magnetización durante el periodo de mezclado determinará el tipo de información que contendrá el espectro.²⁹

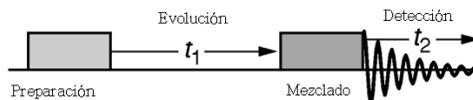


Figura 1. Esquema general de un experimento de RMN en dos dimensiones. El periodo de evolución t_1 es un tiempo variable. Diagrama modificado de la referencia 29.

El proceso de adquisición de un experimento en dos dimensiones se basa en el registro de una señal en función del tiempo, Free Induction Decay (FID), para un experimento de RMN unidimensional. Así, el primer FID adquirido es en el que $t_1=0$, se realiza el registro de una serie de puntos que son almacenados (en la memoria de la computadora), esta serie de datos es llamada primer incremento de t_1 . Como se observa en la figura 2, este proceso se repite a cada incremento de t_1 , que es múltiplo de Δ . El registro de t_2 se realiza en tiempo real.

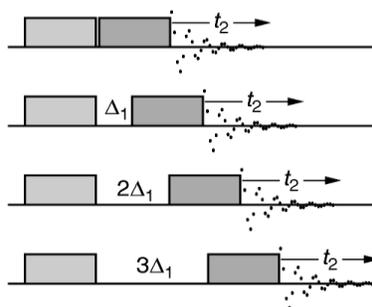


Figura 2. Proceso de adquisición de los espectros unidimensionales que conforman el espectro 2D. Diagrama modificado de la referencia 29.

En un experimento de dos dimensiones se tiene una función, S , que depende de los tiempos t_1 y t_2 , para poder interpretar los resultados de este tipo de experimentos es necesario transformar la función $S(t_1, t_2)$ en una función en el dominio de las frecuencias $\Phi(\omega_1, \omega_2)$, en la figura 3 se muestra el proceso general mediante el cual se procesan los datos adquiridos para obtener un espectro en el dominio de las frecuencias. Si los datos originales se tratan como una matriz, la primera transformada de Fourier se realiza sobre cada renglón, es decir sobre el dominio t_2 para transformar la función a los dominios (t_1, ω_2) posteriormente se realiza la segunda transformada de Fourier sobre las columnas, es decir sobre el dominio t_1 para obtener la función en los dominios (ω_1, ω_2) .

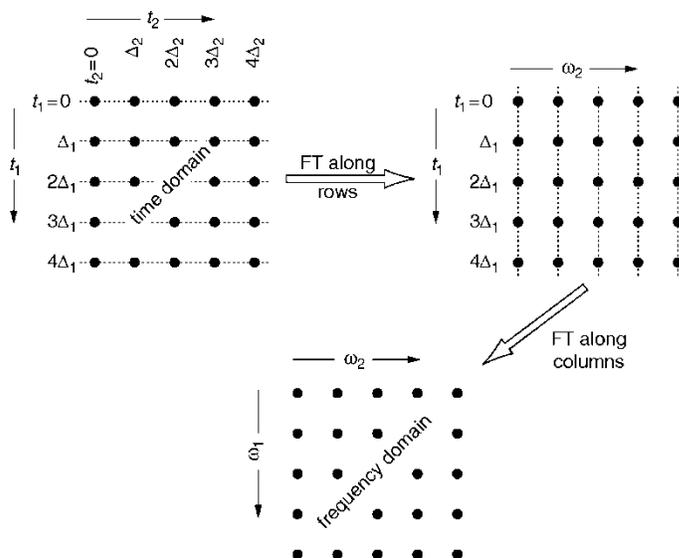


Figura 3. Esquema representativo del procesamiento de los datos para obtener un espectro de 2D. Diagrama modificado de la referencia 29.

Los experimentos bidimensionales deberían ser representados como gráficos tridimensionales. Sin embargo, para facilitar su interpretación se grafican como diagramas de contornos. Un espectro 2D homonuclear presenta una serie de señales que tienen la misma coordenada en los dos ejes, llamadas señales en la diagonal. Además también muestra las

señales llamadas puntos de cruce que se encuentran fuera de la diagonal y cuyas coordenadas corresponden a los desplazamientos químicos de los núcleos que generan las coherencias buscadas.

Experimento COSY (Correlated Spectroscopy). Fue el primer tipo de experimento 2D desarrollado.³⁰ Es un experimento homonuclear muy utilizado para analizar espectros de ^1H . Los puntos de cruce del espectro COSY surgen de la transferencia de coherencia entre núcleos acoplados escalar o indirectamente; en la práctica, las señales observadas están limitadas a protones separados por dos o tres enlaces, ver figura 4.

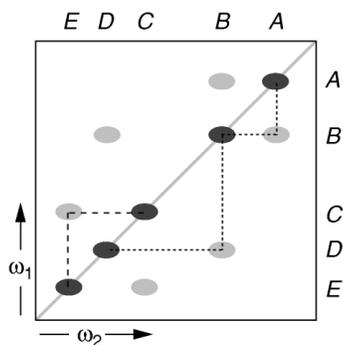


Figura 4. Esquema de un espectro COSY. Se ejemplifican cinco espines cuyo desplazamiento está indicado en las dos dimensiones. Hay dos tipos de señales, las de la diagonal en color negro y los puntos de cruce en color gris. Los picos de la diagonal tienen las mismas coordenadas (desplazamiento, ω) en ambas dimensiones. La aparición de señales en las coordenadas de ω_1 de B y ω_2 de A indican que A y B están acoplados a dos o tres enlaces de distancia. Haciendo un análisis similar podemos determinar que el núcleo D está acoplado con B; y, C con E. Diagrama modificado de la referencia 29.

En el análisis de proteínas, las regiones de interés son: la zona de puntos de cruce de protones de amida y protones α , $^1\text{H}^{\text{N}}-^1\text{H}^{\alpha}$; los puntos de cruce de $^1\text{H}^{\alpha}-^1\text{H}^{\beta}$, la zona de correlaciones de protones aromáticos como tirosina, triptófano o fenilalanina y la zona de correlaciones entre protones de cadenas alifáticas de residuos como leucina, isoleucina o valina. Estas zonas se señalan en el espectro COSY de la toxina clonada, figura 14.

Experimento TOCSY (Total Correlation Spectroscopy). Este experimento es conocido también por el acrónimo HOHAHA (homonuclear Hartman - Hahn) spectroscopy. En el experimento TOCSY se utiliza un mezclado isotrópico para transferir magnetización en fase entre espines a través del Hamiltoniano de acoplamiento escalar, dando como resultado que la magnetización puede ser transferida a través de varios acoplamientos durante el periodo de mezclado. En ausencia de relajación, los puntos de cruce potenciales son los generados por los núcleos resonantes dentro de un mismo sistema de espín. Así, en proteínas, las señales TOCSY generadas son puntos de cruce entre todos los protones de un mismo aminoácido o sistema de espín. Gracias a la gran dispersión de señales en la región del protón de amida, es posible asignar los sistemas de espín completos de cada aminoácido observando las señales que aparecen en el desplazamiento químico de éstos, ver figura 5.

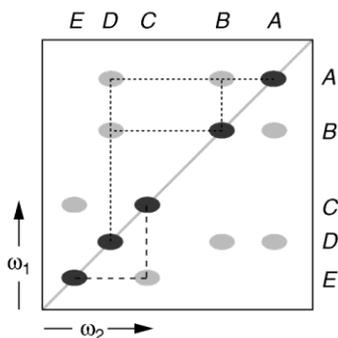


Figura 5. Esquema de un espectro TOCSY. Además de las señales que se observan en el COSY debidas al acoplamiento entre A - B, B - D y C - E, se observa señales entre los núcleos que no están acoplados A y D. El espectro TOCSY contiene puntos de cruce entre estos núcleos ya que están unidos por una cadena ininterrumpida de acoplamientos. Diagrama modificado de la referencia 29.

Experimento NOESY (Nuclear Overhauser - Effect Spectroscopy). Un espectro NOESY de dos dimensiones es muy parecido a un espectro TOCSY, la diferencia radica en que en el espectro NOESY los puntos de cruce no son generados por transferencia de coherencia vía acoplamiento escalar, sino a través del acoplamiento dipolar. El acoplamiento dipolar se presenta a través del espacio y depende tanto de la proximidad de los núcleos involucrados como de la orientación con respecto al campo magnético del equipo, B_0 . La intensidad de las señales debidas al NOE puede ser relacionada con la distancia entre los núcleos que la generan por medio de la ecuación:

$$I_{(\text{NOE})} = k/(r_{\text{AB}})^6$$

Donde k es una constante de proporcionalidad y r_{AB} es la distancia entre el núcleo A y el núcleo B. Es posible observar señales NOE entre núcleos que se encuentran relativamente cerca en el espacio, esto es, a menos de 5 Å de distancia.

El espectro NOESY provee información tal que se puede realizar la asignación secuencial de los aminoácidos de una proteína. El proceso de asignación secuencial se realiza observando la existencia de señales de cruce entre el δ del protón de amida, $^1\text{H}^{\text{N}}$, del aminoácido i y los protones $^1\text{H}^{\text{N}}$, $^1\text{H}^{\alpha}$ y $^1\text{H}^{\beta}$ del aminoácido $i-1$. Además de los NOE's secuenciales, en el espectro se observan NOE's a larga distancia que definirán la estructura terciaria de la proteína. Los NOE's a larga distancia son correlaciones entre protones que se encuentran alejados en la secuencia, pero cercanos en el espacio.

SISTEMA DE EXPRESIÓN

En principio, si se quisiera expresar un gen con alto rendimiento de producción se debería escoger un promotor fuerte y constitutivo. Sin embargo, la mayoría de las veces, este tipo de promotores no aporta el efecto deseado debido a que al estar expresándose permanentemente el gen de interés a alto nivel, pueden sustraerse recursos para el crecimiento normal de las células. Esto es especialmente importante si la proteína foránea tiene efectos negativos para el huésped. Por lo tanto, lo recomendable es emplear promotores regulables que el investigador puede desactivar y activar a voluntad.³¹

Una estrategia común es cultivar la bacteria recombinante hasta que se logra una concentración celular adecuada y entonces recién en esa etapa suministrar la señal para que el

promotor se active y transcriba el gen insertado. Generalmente, los promotores regulables de *Escherichia coli* que se emplean en los vectores de expresión más habituales son promotores fuertes, pero que están en determinadas condiciones reprimidos por las correspondientes proteínas represoras, lo que suministra la base para inducir el gen adyacente cuando sea necesario.

El promotor del operón de la lactosa (*lac*) ha servido para diseñar elementos de control de expresión en numerosos vectores. Mientras en el medio no exista lactosa (o un inductor apropiado), el promotor está reprimido por el represor (producto del gen *lacI*). En el laboratorio, la inducción se suele lograr añadiendo al medio un inductor que, a diferencia de la lactosa, no se metaboliza, pero se une al represor inactivándolo. Ejemplo de este tipo de inductor es el IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosa). Para que el promotor *lac* se exprese a alto nivel, se deberá evitar la represión catabólica. Esto es, que en ausencia de glucosa la proteína CAP se une con AMPc y el complejo se une cerca del promotor, ayudando a la ARN polimerasa a comenzar la transcripción. Para el caso particular de los vectores de expresión, se suele emplear un promotor *lac* mutante, conocido como *lacUV5*, que es más potente que el promotor silvestre. Dicha variante es reprimible por *lacI* e inducible por IPTG.

El promotor del fago T7 necesita la ARN polimerasa específica del mismo fago. Por lo tanto, si se desea expresar genes bajo ese promotor, hay que clonar simultáneamente el gen de la polimerasa de T7. Normalmente este gen de la polimerasa se inserta en el cromosoma de *E. coli* o en el profago lamda (la versión insertada del cromosoma del lamda en las células lisogénicas) y bajo el control del promotor de *lac*. Acto seguido, se procede a transformar las células con la construcción genética dotada del gen de interés “downstream” del promotor del T7. Cuando se añade el inductor IPTG, se induce el gen de la polimerasa de T7, proteína que transcribe a gran nivel el gen clonado.

Vector pET32(a). En este proyecto se empleó el vector de clonación pET32(a), el cual contiene a la proteína de interés dentro del operón *lac*, por lo que se reguló con IPTG. El mecanismo de activación de la expresión involucra tanto al operón *lac*, como al promotor del fago T7 descritos anteriormente. En la figura 6 se esquematiza este mecanismo.

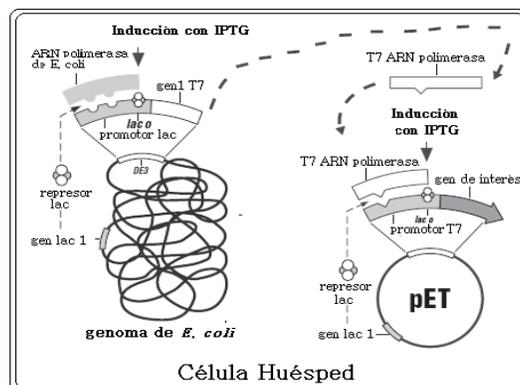


Figura 6. Mecanismo de inducción de los operones T7 y *lac*. Esquema modificado del manual del sistema de expresión pET Novagen®.

OBJETIVOS

- Obtener la toxina GS-tamapina empleando métodos recombinantes.
- Asignar los espectros de RMN 1H COSY, TOCSY y NOESY.

Objetivos Particulares

- Optimizar las condiciones de expresión en *E. coli* de la proteína de fusión (PF) que contiene a la toxina.
- Purificar la PF empleando cromatografía de afinidad metal quelato (CAMQ).
- Optimizar las condiciones de corte de la PF con la proteasa trombina.
- Purificar la toxina empleando cromatografía de líquidos y optimizando las condiciones de separación.
- Realizar pruebas que permitan caracterizar la toxina.
- Obtener, procesar e interpretar los experimentos de RMN – ¹H, COSY, TOCSY y NOESY.
- Calcular la estructura tridimensional de la toxina, considerando las restricciones de RMN, empleando el programa CYANA

HIPÓTESIS

La toxina recombinante GS-tamapina expresada en la cepa *E. coli* rosseta gami empleando el plásmido pET32(a) modificado tendrá la estructura terciaria de la tamapina.

METODOLOGÍA

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La realización de este proyecto se divide en 5 partes importantes que se describirán en las secciones siguientes y se presentan a continuación:

1. Transformación de células competentes de *E. coli*.
2. Optimización de las condiciones para obtener proteína recombinante.
3. Purificación de la proteína.
4. Pruebas de caracterización.
5. Obtención, procesamiento e interpretación de espectros de RMN.

1. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli*

Para la realización de este paso se emplearon células químico competentes de la bacteria *E. coli*, cepa Rosetta gami (DE3) y el plásmido pET32a modificado que contiene la secuencia codificante de la proteína de fusión (PF). La transformación se realizó mediante el siguiente procedimiento:

- a) Se agrega 1 μL de una disolución de plásmido, que tiene una concentración aproximada de 90 ng/mL, a 50 μL de una suspensión de células competentes de la cepa mencionada y se mezcla cuidadosamente.
- b) Se incuba la mezcla por 20 min en hielo.
- c) Después de la incubación en hielo se coloca el tubo de la mezcla en un baño de agua a 42 °C por 45 segundos.
- d) El tubo de la mezcla se coloca en hielo por 2–5 minutos.
- e) Se agregan 500 μL de medio de cultivo LB y se deja incubando a 37 °C por una hora.
- f) Se siembran 50 mL de la suspensión de células en medio LB agar que contiene 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y se dejan incubando de 14 a 18 horas a 37 °C.

2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA OBTENER PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para optimizar las condiciones de producción de la proteína de fusión fue necesario considerar que la cepa empleada tiene modificaciones importantes que están asociadas a la resistencia a los antibióticos cloramfenicol, kanamicina y tetraciclina. Así, las condiciones de crecimiento y producción de proteína incluyeron siempre la concentración adecuada de cada uno de los antibióticos en todos los medios de cultivo, ver tabla de concentración de antibióticos.

Antibiótico	Concentración [$\mu\text{g/mL}$]
Ampicilina	100
Kanamicina	15
Cloramfenicol	32
Tetraciclina	12

Tabla 1. Concentraciones de antibióticos en los medios de cultivo.

El crecimiento de células se realizó cada vez a partir de una colonia aislada después de la transformación con el vector de clonación. Se picó la colonia, se suspendió en 5 mL de medio LB y se dejó incubando por 14–18 horas a 37 °C; este inóculo se sembró en 1L de medio LB y se monitoreó el crecimiento a 37 °C midiendo la densidad óptica (D.O.) a 600nm. Cuando la D.O. llega a un valor de 0.7 se realizó la inducción de la expresión de la PF agregando un volumen de una disolución *Stock* IPTG de concentración 100 mM. Se evaluó el efecto de la variación de la concentración de IPTG agregando diferentes volúmenes de la disolución *Stock* tal que la concentración de IPTG fue de 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mM en el medio de cultivo.

Otro parámetro optimizado fue la temperatura de inducción, la cual se modificaba unos minutos antes de agregar el IPTG, se probó la inducción a 37°C y 30°C.

También se monitoreó la producción de proteína en función del tiempo para encontrar el tiempo óptimo de inducción. El monitoreo se realizó sacando una muestra de 1 mL de la suspensión de células aproximadamente cada 2 horas a partir del momento de la inducción. Al extraer la muestra se centrifugó a 5000 g, se descartó el sobrenadante y el paquete celular puede ser guardado en congelación hasta su posterior procesamiento. Se realizó una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS–PAGE) al 13% para observar la producción de proteína recombinante; los paquetes celulares del muestreo se procesaron de la forma siguiente:

- i) Se resuspende cada paquete celular en 60 μ L de disolución de lisis.
- ii) Se sónica la suspensión a 50 W por un total de 90 s en intervalos de 15 s con intermedios de 1 min en hielo.
- iii) Se centrifuga el lisado y separar el sobrenadante.
- iv) Se adiciona 60 μ L de disolución de carga para geles de electroforesis desnaturizante tanto al sobrenadante como al paquete de residuos insolubles.
- v) Se resuspende el paquete de residuos insolubles.
- vi) Se colocan todas las muestras en un baño de agua a temperatura de ebullición por 5 min. antes de cargar en los pozos del gel.

Todos los geles se corrieron en una cámara de electroforesis con la disolución de tanque a un voltaje inicial de 80V por 20 min y después se aumentó el voltaje a 100V por 50–80 min. Los geles se revelan con la disolución de tinción.

3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA

La purificación de la proteína se realiza a partir de los paquetes celulares que se obtienen al centrifugar a 6000 g los medios de cultivo inducidos con IPTG. La primera parte consiste en la liberación de la PF a partir de las células haciendo una lisis. La lisis se realiza resuspendiendo los paquetes celulares en aproximadamente 20 mL de disolución A por gramo de bacterias; posteriormente se rompen las células sometiendo la suspensión a golpes sónicos con una potencia de 55–60 W por un tiempo total de aproximadamente 10 min en intervalos de 20 s con

intermedios de 2 min. El contenedor de la suspensión se coloca en un baño de hielo durante todo el proceso de sonicación. El lisado celular se centrifuga a 32 000 g por 25 min, el paquete de residuos insolubles se descarta ya que la PF se encuentra en el sobrenadante.

Los pasos siguientes para obtener la toxina pura, se pueden dividir en cuatro, la purificación de la PF por cromatografía de afinidad metal-quelato, la reacción de proteólisis de la PF y la purificación de la toxina por cromatografía de líquidos.

Purificación de la PF por cromatografía de afinidad metal-quelato (CAMQ). El sobrenadante se filtra con una membrana de tamaño de poro de 0.45 μ m y se hace pasar por una columna HiTrap® cargada con Ni²⁺, una vez retenida la PF en la columna se realizan una serie de lavados que se describen a continuación:

- El primer lavado se realiza con 5-10 volúmenes de disolución A. Nota: un volumen corresponde al volumen muerto de la columna usada.
- El segundo lavado se realiza con 5 volúmenes de la disolución B, que contiene una concentración de imidazol de 20 mM.
- Se recupera la PF con 2.5 volúmenes de la disolución C, que contiene imidazol 500 mM.
- Se elimina el exceso de imidazol dializando en la disolución D con una membrana de MWCO (molecular weight cut off)= 10 000.

Reacción de proteólisis de la PF. Para liberar a la GS-Tamapina se realizó un corte con la proteasa trombina. Se colocó en un tubo falcon® de 15 mL 100 μ L de la suspensión de partículas con trombina del Kit de SIGMA®, se adicionó aproximadamente 5 mg de PF (en disolución), 500 μ L de disolución amortiguadora para corte y se llevó a 5 mL con agua desionizada. La mezcla de reacción se coloca en agitación por 4 horas y se detiene la reacción separando las partículas que contienen la trombina por decantación o filtración.

La disolución de reacción se filtra con una membrana de 0.45 μ m y se hace pasar nuevamente por una columna HiTrap® cargada con Ni²⁺. La disolución que pasó por la columna se recolecta, ya que en ésta se encuentra la GS-tamapina. La estructura primaria de la proteína liberada es:

GS AFC NLRR C ELSCR SLG LL GK CIG EECKC VPY.

Purificación de la GS-tamapina por cromatografía de líquidos. Para realizar este paso de purificación inicialmente se emplearon las condiciones reportadas por Barona³² para separación de toxinas del veneno de alacrán con un gradiente lineal de H₂O/CH₃CN con ácido trifluoroacético (TFA) en los disolventes. El gradiente se optimizó para obtener la GS-tamapina con la mayor pureza posible. En la figura 7 se muestra el gradiente optimizado. La separación se realizó con un flujo de 1 mL/min detectando a una longitud de onda de 280 nm.

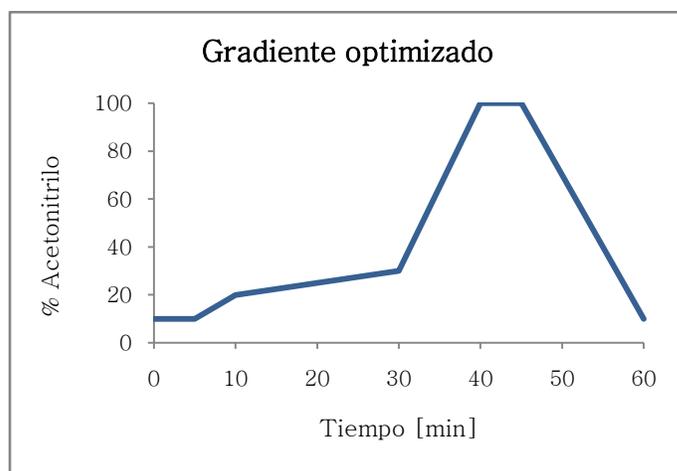


Figura 7. Gradiente optimizado para la purificación de la GS-tamapina.

La separación se realiza en los primeros 30 min; de 30 a 60 minutos, se realiza un lavado a la columna para eliminar residuos de la mezcla de reacción. La separación se realizó con un equipo Varian ProStar empleando una columna analítica phenomenex® Jupiter C₁₈ de 250×4.6 mm y una columna semipreparativa phenomenex® Jupiter C₁₈ de 100×12.2 mm.

Se empleó el mismo gradiente tanto para la separación analítica como para la semipreparativa. El flujo al que se realizó la separación analítica fue de 1 mL/min, mientras que la separación semipreparativa se realizó a un flujo de 5 mL/min.

Por último, para obtener la toxina sólida se eliminó el agua y el acetoneitrilo por liofilización.

4. PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN

Se realizaron las siguientes pruebas de caracterización.

Espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI). Se realizó empleando 100 µL de una disolución de toxina de concentración 1ng/mL con 0.1% de ácido fórmico.

UV. El espectro de UV fue obtenido con una disolución acuosa de la toxina contenida en una concentración de 0.3 mg/mL.

5. OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO E INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS DE RMN-¹H

Para obtener los espectros de RMN-¹H se prepararon 300 µL de una disolución 10 mg/mL (2.77 mM) de proteína con 5% de D₂O. Se realizaron los experimentos COSY, TOCSY (tiempo de mezclado de 0.075s) y NOESY (tiempos de mezclados de 0.10, 0.15, 0.20, 0.30 y 0.40 s) en un equipo Varian Inova de 500 MHz en una sonda indirecta de tres núcleos de 3mm a 297 K del Instituto de Química de la UNAM.

Una vez adquiridos los FID's de cada experimento, se realizó el procesamiento de los datos, en el programa nmrPipe, y el ajuste de fase auxiliándose con la interfaz gráfica nmrDraw.

Los espectros obtenidos se convierten a formato CARA 1.5 y XEASY.

Se realizó la asignación de las señales de los sistemas de espín de la toxina en el programa CARA 1.5 empleando la herramienta NEASY.

Asignación de los sistemas de espín. Para realizar la asignación de los sistemas de espín de la GS-tamapina, primero se traslaparon los espectros COSY y TOCSY, analizando las señales, comparándolas con los patrones conocidos que se presentan en los aminoácidos y comparando con la secuencia primaria de la toxina, se identificaron los tipos de aminoácidos observados en el espectro. El análisis se realiza inicialmente en la región donde aparecen las señales de ^1H de amida (6–9.5 ppm) ya que en esta región hay una mayor dispersión de las señales.

Asignación secuencial de los sistemas de espín. Una vez asignado el tipo de aminoácido al que corresponden las señales del espectro TOCSY se procede con la asignación secuencial empleando el espectro NOESY. Para esto se traslapan los espectros TOCSY y NOESY. Las señales NOE diferentes a las señales TOCSY corresponden a correlaciones en el espacio. En general, en el desplazamiento químico del ^1H de amida de un aminoácido se obtienen señales NOE de los protones de la cadena lateral del aminoácido anterior en la secuencia, ya que son los protones más cercanos. Además de las señales mencionadas, se observan NOE's de residuos cercanos en el espacio y que no son los secuenciales, estas señales son evidencia de la estructura tridimensional del péptido.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

A continuación se presentan los resultados más importantes obtenidos en el procedimiento experimental.

1. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Al realizar la transformación de células de *E. coli* Rosetta gami se obtuvieron colonias aisladas. Además de la transformación con plásmido se sembraron controles, que son bacterias a la que se realizó el procedimiento de transformación sin agregar plásmido. El control positivo se sembró en medio LB sin antibiótico y el negativo en LB con ampicilina 100 µg/mL. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Crecimiento	
Transformación	Si
Control +	Si
Control -	No

Tabla 2. Resultados de la transformación de *E. coli* Rosetta gami.

2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA OBTENER PROTEÍNA RECOMBINANTE

Al monitorear el crecimiento de las bacterias 600 nm la D. O. de 0.7 se alcanzó aproximadamente en 4 - 5 horas después de sembrar el inóculo de 5 mL.

Se encontró que el tiempo óptimo de inducción es de 6 a 8 horas a 30°C, los resultados del monitoreo se muestran en la figura 8. Como se observa en el gel de poliacrilamida, la expresión basal de la bacteria no incluye a la proteína de fusión. A dos horas de inducción ya hay expresión observable de la PF, lo que es evidencia del efecto del IPTG sobre el operón lac.

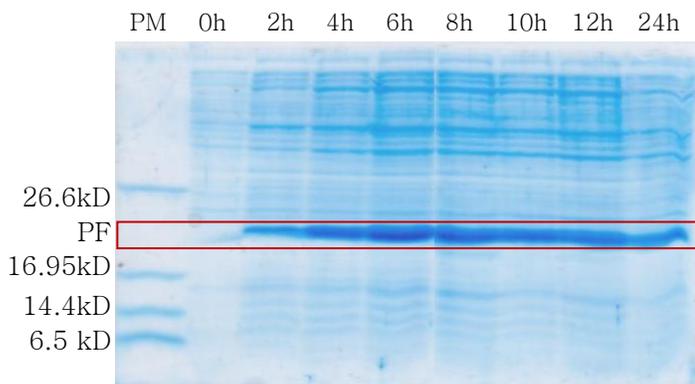


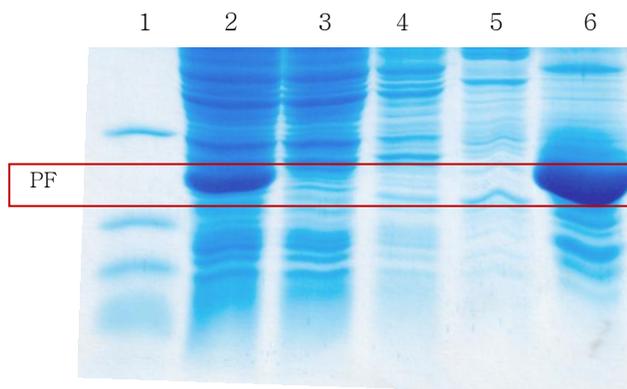
Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 13%. Seguimiento de la inducción de expresión de PF. En el primer carril se cargó el estándar de pesos moleculares de BIO-RAD, en los carriles siguientes se colocaron los muestreos del cultivo. El tiempo cero corresponde al cultivo antes de agregarle IPTG. La concentración final de IPTG en el medio es de 0.5 mM.

3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Purificación de la PF por CAMQ. Después del tiempo de inducción se obtiene una cantidad de biomasa de aproximadamente 4 g/L de cultivo. El seguimiento de la purificación de la proteína de fusión por CAMQ se muestra en el gel de la figura 9. Los resultados fueron óptimos ya que al hacer pasar el sobrenadante de la lisis celular por la columna HiTrap® activada con Ni²⁺ se retiene toda la PF, los lavados muestran eliminación de proteínas de baja afinidad por la columna sin desplazar la PF. La elusión de la PF con imidazol fue adecuada. Analizando el gel se observa que al eluir la PF, en la fracción se encuentran presentes otras proteínas que tienen afinidad a la columna.

Figura 9. Seguimiento de la purificación de la PF por CAMQ. A continuación se describe el contenido de los carriles del gel de electroforesis.

- 1.- PM BIO-RAD.
- 2.- Lisado celular.
- 3.- Lisado celular después de pasar por la columna HiTrap®.
- 5.- Lavado con disolución A.
- 6.- Lavado con disolución B.
- 7.- Elusión de la PF.



Reacción de proteólisis de la PF. Al realizar la reacción de corte con la proteasa trombina se obtuvo un tiempo óptimo de reacción de 4 horas. En el gel de electroforesis (figura 10) se observa que a las dos horas de reacción se ha cortado la mayor parte de la PF quedando residuos de menor peso molecular. Así, se determinó que el tiempo óptimo para realizar la reacción de corte es de 3 a 4 horas.

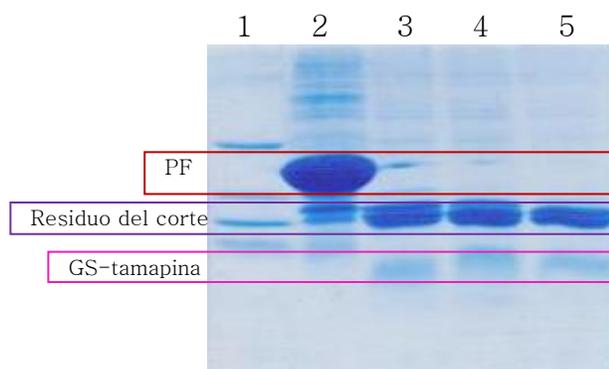


Figura 10. Gel del corte de la PF con trombina. En el carril 2 se muestra la mezcla de reacción al momento de agregar la proteasa, en los carriles siguientes se cargó una muestra de la reacción a 2, 4 y 6 horas de haber iniciado.

Purificación de la GS-tamapina por cromatografía de líquidos. Después de llevar a cabo la reacción de corte con trombina, la mezcla de reacción se hizo pasar por la columna HiTrap® para remover los fragmentos proteínicos que contienen la secuencia de histidinas. Como se observa en el gel de la reacción de corte hay dos residuos de aproximadamente 16kDa, considerando que después de pasar la mezcla de reacción por la columna de afinidad aun queda residuo peptídico; se cree que uno de los dos fragmentos contiene la His₆ y el otro no ya que al pasar la mezcla por la columna HiTrap® uno de los residuos se elimina y el otro permanece en la disolución. A pesar de lo anterior, la existencia de este residuo no afecta el paso de purificación por cromatografía de líquidos. Los resultados de la purificación de la toxina con el gradiente optimizado se muestran en la figura 11. En el cromatograma se observa un primer pico en un tiempo de retención, RT, de 18.4 min, al realizar espectrometría de masas al componente de este pico, se encontró que coincidía con el peso de la toxina. Más adelante se detallarán los resultados de la espectrometría de masas. El segundo pico presentó una masa 500 Da menor a la de la GS-tamapina. Los componentes que eluyen son residuos de la reacción de corte.

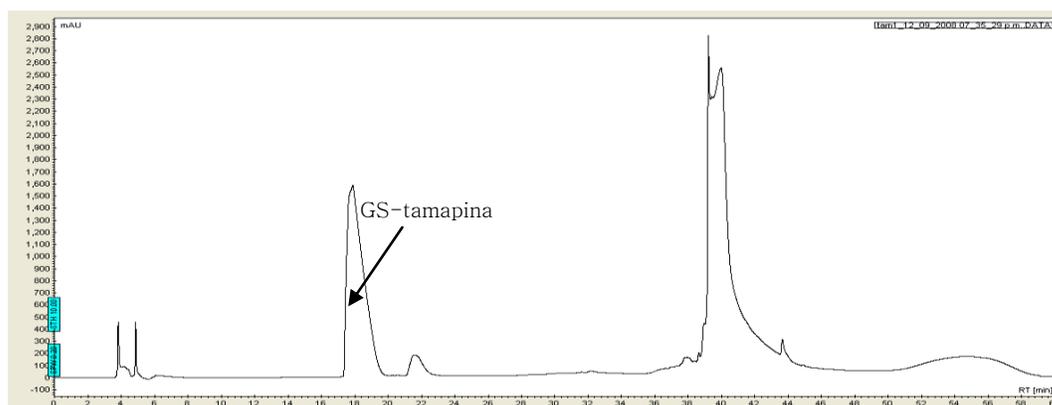


Figura 11. Separación por cromatografía de líquidos de toxina proveniente de la mezcla de reacción de corte; en esta separación se empleó la columna analítica. La GS-tamapina se encuentra en un tiempo de retención de 18.4 min. El pico que se encuentra en un RT de 21.7 min corresponde a un compuesto de 3118 Da. La serie de picos que eluyen después de 36 minutos son residuos del corte con trombina.

4. PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN

Espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI). El espectro de masas obtenido en el equipo Bruker del Instituto de Química muestra los iones multicargados $[M+3H]^{3+}$, $[M+4H]^{4+}$ y $[M+5H]^{5+}$ (figura 12). Al procesar los datos se obtiene una masa promedio de 3604. Considerando que la masa de la GS-tamapina, calculada a partir de las masas promedio de cada aminoácido, es de 3603.3, la masa encontrada por ESI es la esperada.

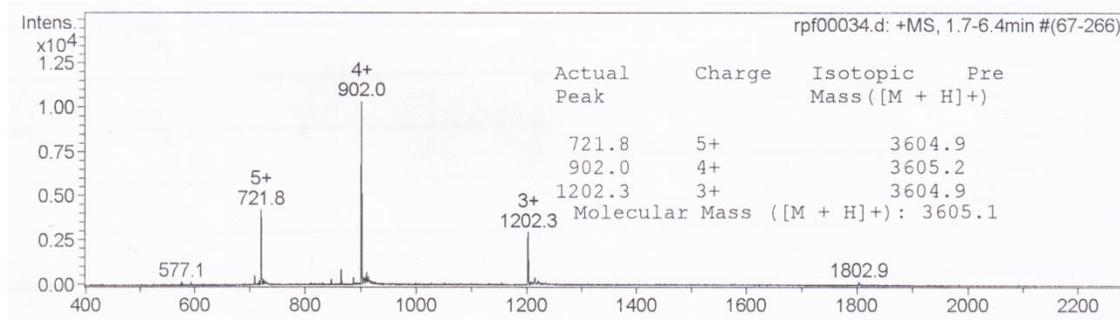


Figura 12. Espectro ESI. Se pueden observar los fragmentos policargados de la toxina.

Así, se decidió obtener los espectros de masas por ESI con una mayor resolución para determinar experimentalmente con mayor precisión la masa promedio de la toxina recombinante. Los resultados obtenidos (figura 13) muestran que la masa promedio está alrededor de 3603.5, lo cual coincide con el cálculo realizado considerando que se han formado los tres puentes disulfuro.

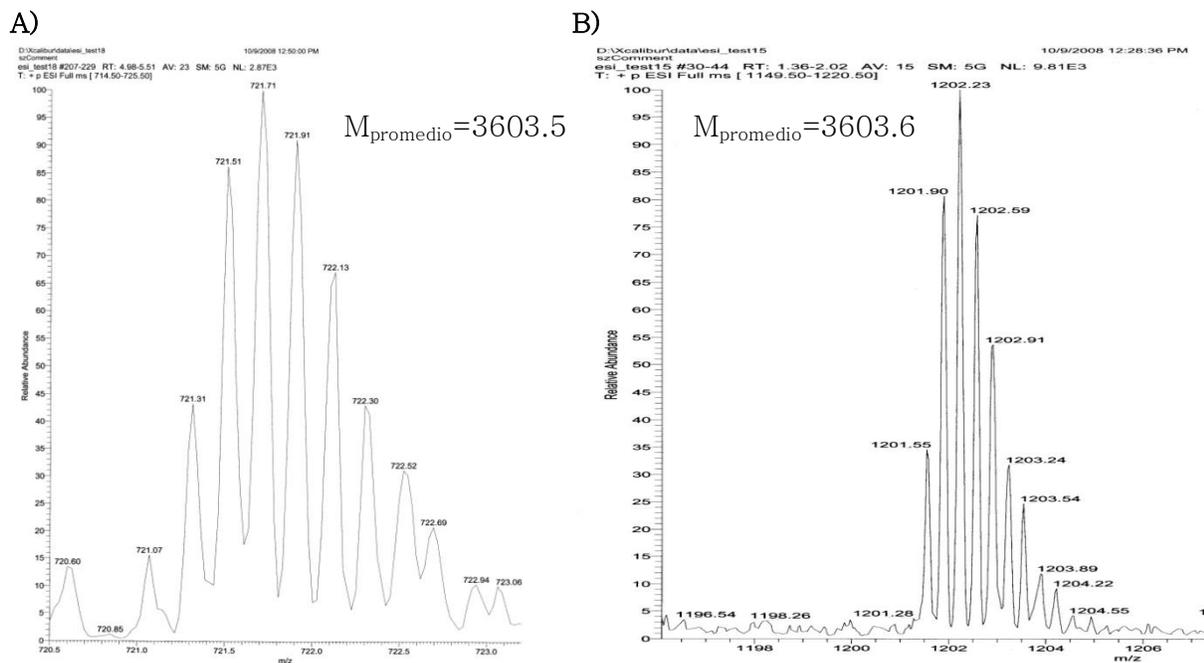


Figura 13. A) Espectro de ESI en la región del ión $[M+5H]^{5+}$. B) Espectro ESI en la región del ión $[M+3H]^{3+}$.

Al obtener el espectro de UV se obtuvo un máximo en 275 nm lo que coincide con lo esperado, considerando que la toxina contiene dos residuos aromáticos, fenilalanina y tirosina, los cuales absorben a esta longitud de onda.

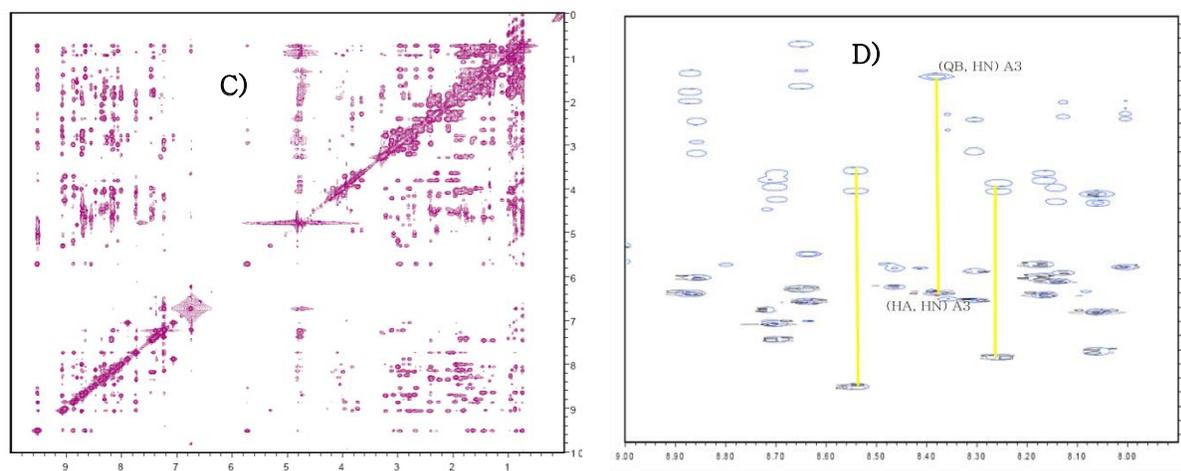


Figura 15. A) Espectro COSY de la GS-tamapina, se muestran las diferentes regiones del espectro. En el recuadro azul se observan las señales de correlación entre el protón de amida H^N y el protón alfa del mismo aminoácido H^α . en el recuadro verde se señalan las correlaciones entre los H^α y H^β . en la región marcada en naranja se encuentran las correlaciones entre protones aromáticos y en el recuadro rosa la correlación entre los protones de las cadenas alifáticas de algunos aminoácidos. B) Espectro TOCSY de la GS-tamapina. C) Espectro NOESY de la GS-tamapina. D) Sobreposición de espectros COSY y TOCSY, expansión de la región de protones de amida. El espectro COSY se muestra en colores negro-gris y el TOCSY en color azul. Las señales COSY corresponden a correlaciones $H^N - H^\alpha$; se ejemplifica la asignación de las señales de la alanina 3, se marca la señal COSY de la correlación entre el protón alfa (HA) y el protón de amida (HN) y la señal TOCSY de la correlación entre el HN y los tres protones del metilo de la cadena lateral (QB).

Sobreponiendo los espectros COSY/TOCSY se logró encontrar los sistemas de espín de 29 de los 31 aminoácidos (94%). Cabe aclarar que el traslape en la zona de correlaciones entre protones de cadena alifática no permitió hacer las asignaciones correspondientes. Sin embargo, la dispersión en la región de los protones de amida ayudó a completar la identificación de los diferentes aminoácidos. Analizando el espectro NOESY sobrepuesto con el espectro TOCSY se logró encontrar las correlaciones de aa secuenciales e identificar inequívocamente el 75% de la secuencia de los residuos de la GS-tamapina.

CONCLUSIONES

- Se logró obtener expresión de la proteína de fusión en *E. coli* Rosetta gami con un rendimiento de 20 mg/L de cultivo.
- La purificación de la proteína de fusión por CAMQ fue exitosa ya que se logró separarla de forma sencilla de una mezcla proteica compleja.
- La hidrólisis de la PF con trombina inmovilizada fue eficiente, ya que en 4 horas se obtiene un corte cuantitativo.
- Se logró separar la GS-tamapina por cromatografía en fase reversa empleando el gradiente optimizado.
- Se obtuvo la GS- tamapina con un rendimiento de 1.7 mg/L de cultivo.
- El experimento de masas ESI demostró que la toxina se encuentra íntegra con respecto a su contenido de aminoácidos y que presenta tres puentes disulfuro formados.
- Los experimentos de RMN-¹H muestran que la GS-tamapina contiene la secuencia esperada.
- Se logró asignar los sistemas de espín del 94% de los aminoácidos de la GS-tamapina en los espectros COSY y TOCSY.
- Se ha realizado el 75 % de la asignación secuencial en el espectro NOESY.

PERSPECTIVAS

- Terminar la asignación secuencial para poder realizar los cálculos de dinámica molecular con el programa CYANA y obtener la estructura terciaria de la GS-tamapina.
- Optimizar la estructura obtenida con CYANA mediante cálculos de dinámica molecular.
- Realizar pruebas de actividad frente a canales de K⁺ con el fin de analizar su comportamiento como toxina bloqueadora de este tipo de canales.
- Obtener toxinas mutadas en sitios dirigidos, determinar su estructura, realizar pruebas de actividad y estudios de acoplamiento a canales de K⁺, con el fin de determinar el mecanismo de interacción toxina-canal.
- Determinar los factores estructurales de la tamapina que le dan alta selectividad y afinidad por los canales K_{Ca} 2.1.
- Definir la posibilidad de emplear a la tamapina o un péptido similar como fármaco para controlar la actividad de los canales mencionados y desarrollar un tratamiento para enfermedades como la epilepsia o el Alzheimer.

APÉNDICE A. Disoluciones

Las disoluciones empleadas en la realización del procedimiento experimental se listan a continuación.

- Medio Luria Bertani (LB). Contiene NaCl 10g/L, extracto de levadura 5g/L y Triptona 10g/L.^a
- Stock de Ampicilina, 100mg/mL.^{b, c}
- Stock de Kanamicina 15mg/mL.^{b, c}
- Stock de Cloramfenicol 32mg/mL.^{c, d}
- Stock de Tetraciclina 6.25mg/mL.^{c, d}
- Stock de isopropil-β-D-1-tiogalactosa (IPTG) 0.1 M.^{b, c}
- Disolución de carga para geles SDS-PAGE. TrisCl 0.12 M pH=6.8, SDS 4.1%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.2 g/L.
- Disolución para cámara de electroforesis. Tris base 25 mM, glicina 0.2 M, SDS 0.1%.
- Disolución de tinción para geles SDS-PAGE. Azul de coomasie G-250 0.025%, ácido acético 20% y metanol 40%.
- Disolución A (disolución de lisis). Tris pH=8 50 mM y NaCl 300 mM
- Disolución B. Tris 50 mM pH=8, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM.
- Disolución C. Tris 50 mM pH=8, NaCl 300 mM e imidazol 500 mM.
- Disolución de diálisis. Tris pH=8 20 mM, NaCl 150 mM y EDTA 100 μM.
- Disolución de corte. Tris pH=8 50 mM, NaCl 150 mM y CaCl₂ 5 mM
- Agua con ácido trifluoroacético (TFA) 0.05%
- Acetonitrilo con TFA 0.05%

^a Esterilizada en autoclave

^b Disolución en agua desionizada.

^c Esterilizada por filtración.

^d Disolución en etanol.

REFERENCIAS

1. Pedarzani P.; D'hoet, D.; Doorty, K. B.; Wadsworth, J. D. F.; Joseph, J. S.; Jeyaseelan, K.; Kini, R.; Gadre, S.; Sapatnekar, S.; Stocker, M.; Strong, P. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 46101.
2. Hougaard C.; Eriksen, B. L.; Jorgensen, S.; Dyhring, T.; Madsen, L. S.; Strobaek, D.; Christophersen, P. *B. J. Pharm.* **2007**, *151*, 655.
3. Andreotti N.; Di Luccio, E.; Sampieri, F.; De Waard, M.; Sabatier, J.-M. *Peptides* **2005**, *26*, 1095.
4. Rodríguez de la Vega, R.C.; Merino, E.; Becerril, B.; Possani, L. D. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 222.
5. Tytgat, J.; Chandry, K. G.; García, M. L.; Gutman, G. A.; Martin-Eauclaire, M.-F.; Van der Walt, J. J.; Possani, L. D. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20*, 444.
6. Prochnicka-Chalufour, A.; Corzo, G.; Satake, H.; Martin-Eauclaire, M. F.; Murgia, A. R.; Prestipino, G.; D'Suze, G.; Possani, L. D.; Delepierre, M. *Biochemistry* **2006**, *45*, 1795.
7. Freñal, K.; Xu, C. Q.; Wolff, N.; Wecker, K.; Gurrola, G. B.; Zhu, S. Y.; Chi, C. W.; Possani, L. D.; Tytgat, J.; Delepierre, M. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2004**, *56*, 367.
8. Rodríguez de la Vega, R. C.; Possani, L. D. *Trends Genet.* **2005**, *21*, 330.
9. Du Plessis L.H.; Elgar D. *Toxicol.* **2008**, *51*, 1.
10. Miller, C. *Neuron* **1995**, *15*, 5.
11. Cavanagh, J. Protein NMR Spectroscopy. *Academic Press* **1996** EUA.
12. Ohnishi, S.; Günter, P.; Koshiba, S.; Tomizawa, T.; Akasaka, R.; Tochio, N.; Sato, M.; Inoue, M.; Harada, T.; Watanabe, S.; Tanaka, A.; Shirouzu, M.; Kigawa, T.; Tokoyama, S. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 462.
13. Kortemme, T.; Kelly, M. J. S.; Kay, L. E.; Forman-Kay, J.; Serrano, L. *J. Mol. Biol.* **2000**, *297*, 1217.
14. Pérez-Canadillas, J. M.; Santoro, J.; Campos-Olivas, R.; Lacadena, J.; Martínez del Pozo, A.; Gavilanes, J. G.; Rico, M.; Bruix, M. *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 1061.
15. Edmonds, L.; Liu, A.; Kwan, J. J.; Avanesy, A.; Caracoglia, M.; Yang, I.; Maxwell, K. L.; Rubenstein, J.; Davidson, A. R.; Donaldson, L. W. *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 175.
16. Duarte, A. M. S.; Wolfs, C.; van Nuland, N.; Harrison, M.; Findlay, J.; van Mierlo, C.; Hemminga, M. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes* **2007**, *1768(2)*, 218.
17. Rothmund, S.; Liou, Y.; Davies, P. L.; Krause, E.; Sönnichsen, F. *Structure* **1999**, *7(11)*, 1325.
18. Wang, Q.; Deloia M. A.; Kang, Y.; Litchke, C.; Zhang, N.; Titus, M. A.; Walters, K. *Protein Sci.* **2007**, *16(2)*, 189.
19. Spadaccini, R.; Cresenzi, O.; Tancredi, T.; De Casamassimi, N.; Savino, G.; Scoginamiglio, R.; Di Donato, A.; Temussi, P. A. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 505.
20. Brockman, C.; Leitner, D.; Labudde, D.; Dihel, A.; Siebert, V.; Büssov, K.; Kühne, R.; Oschkinath FEBS Lett. **2004**, *558*, 101.
21. Liew, C. K.; Crosslei, M.; McKay, J. P.; Nicholas, H. R. *J. Mol. Biol.* **2007**, *366(2)*, 382.
22. Navarro-Aviles, G.; Jimenez, M. A.; Perez-Marin, M. C.; González, C.; Rico, M.; Murillo, F. J.; Elias-Arnanz, M.; Patmanabhan, S. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63(4)*, 980.
23. Kikkou, T.; Matsumoto, O.; Ohkubo, T.; Kobayashi, Y.; Tsujimoto, G. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2007**, *352*, 17.
24. Monleón, D.; Martínez-Vicente, M.; Esteve, V.; Yim, L.; Prado, S.; Armengot, M. E.; Celda, B. *Proteins* **2007**, *66(3)*, 729.
25. Ferentz, A. E.; Wagner, G. Q. *Rev. Biophys.* **2000**, *33*, 29.
26. Rehm, T.; Huber, R.; Holak, T. A. *Structure* **2002**, *10*, 1613.
27. Snyder, D. A.; Chen, Y.; Denissova, N. G.; Acton, T.; Aramini, J. M.; Ciano, M.; Karlin, R.; Liu, J.; Manorg, P.; Rajan, P. A.; Rossi, P.; Swapna, G. V. T.; Xiao, R.; Rost, B.; Hunt, J.; Montelione, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16505.
28. Yee, A. A.; Savchenko, A.; Ignachenko, A.; Lukin, J.; Xu, X.; Scarina, T.; Evdokimova, E.; Liu, C. S.; Semesi, A.; Guido, V.; Edwards, A. M.; Arrowsmith, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16512.
29. Keeler, J. *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons **2005** England.
30. Keeler, J. *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons **2005** England.
31. De Mey, M.; Maertnes, J.; Lequeux, G. B.; Soetaert, W. K.; Vandamme, E. J. *BMC Biotechnology* **2006**, *7*, 34.
32. Barona, J.; Batista, C.; Zamudio, F.; Gómez-Lagunas, F.; Wanke, E.; Otero, R.; Possani, L. *Biochem. et Biophys. Acta* **2006**, *76*, 1764.

Vo. Bo.

Sustentante



Dr. J. Federico del Río Portilla

Q. Belén Ernestina Ramírez Cordero